动 物 学 研 究 2003, Aug. 24 (4): 241 ~ 248 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

基于线粒体 12*S* 和 16*S* rRNA 基因部分序列的角蟾亚科部分属种的系统发育关系

江建平[1,3]，袁富蓉[2]，谢 锋[1]，郑中华[1]
（1. 中国科学院成都生物研究所，四川 成都 610041；2. 美国德克萨斯大学 医学中心生理学系，圣安东尼奥 78229 - 3900）

摘要：测定了角蟾亚科 2 属 8 种（亚种）和外群 3 种的线粒体 12*S* 和 16*S* rRNA 基因部分 DNA 序列，比对后序列长共 949 bp，其中变异位点数 320，简约位点数 206。邻接法和最大简约法分析的系统关系树一致表明内群为一单系群，其中腺角蟾首先与其他物种分开；沙坪角蟾与宽头短腿蟾聚为一支；余下的 5 种（亚种）角蟾组成一支，其中小角蟾短肢亚种的广西种群和香港种群聚为一亚支，另一亚支包括峨眉角蟾、小角蟾指名亚种、尾凸角蟾和重庆武隆的角蟾种，后两种角蟾进化关系最近。本结果支持短肢角蟾为有效种，同时提示腺角蟾、沙坪角蟾与宽头短腿蟾可能隶属 3 个不同的亚属或属。

关键词：角蟾亚科；角蟾属；短腿蟾属；无耳蟾属；12*S* rRNA 基因；16*S* rRNA 基因；系统发生关系
中图分类号：Q959.53 **文献标识码**：A **文章编号**：0254 - 5853(2003)04 - 0241 - 08

Phylogenetic Relationships of Some Species and Genera in Megophryids Inferred from Partial Sequences of Mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA Genes

JIANG Jian-ping[1,3], YUAN Fu-rong[2], XIE Feng[1], ZHENG Zhong-hua[1]
(1. *Chengdu Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Chengdu* 610041, *China*;
2. *Department of Physiology, the University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX* 78229 - 3900, *USA*)

Abstract: Fragments of mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA genes of 17 individuals were sequenced, including 8 species (subspecies) of 2 genera *Megophrys* and *Brachytarsophrys* of Megophrinae, and 3 species used as outgroup including the genera *Bombia*, *Oreolalax* and *Scutiger*. Results pairwised by Clustal W show that there are 949 bp in length with 320 variable sites including 206 parsimony sites. The average contents of T, C, A, and G are 25.6%, 24.0%, 29.8%, and 20.6%, respectively, and the ratio of transition to transvertion is 1.3. The phylogenetic relationships of these taxa were analyzed using programs of Neighbor-Joining and Maximum Parsimony. The results show that the ingroup are clustered together as one clade, of which 3 individuals of *M. glandulosa* were clustered together (BSP = 100%) and firstly diverged from the other taxa (BSP = 100%), 3 individuals of *B. carinensis* were clustered together (BSP = 100%) as sister group of *M. shapingensis*, the rest 5 taxa formed together and included two groups, one consisting of two populations of *M. minor brachykolos* from Longsheng of Guangxi and Hong Kong, the other containing *M. omeimontis*, *M. minor minor*, *M. caudoprocta* and *M.* sp from Wulong of Chongqing, the later two species are closely related. These results support *M. brachykolos* as a valid species rather than a subspecies of *M. minor*, and suggest that *M. glandulosa*, *M. shapingensis* and *B. carinensis* may belong to three different subgenera or genera.

Key words: Megophryinae; *Megophrys*; *Brachytarsophrys*; *Atympanophrys*; 12*S* rRNA gene; 16*S* rRNA gene; Phylogenetic relationship

---

收稿日期：2003 - 01 - 07；接受日期：2003 - 04 - 21
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30000018）；中国科学院生物科学与技术特别支持费资助项目（STZ - 01 - 19）；四川省科技厅重点项目；香港野生动物保护基金会有限公司（WCF）项目
3. 通讯作者（Corresponding author），E-mail：jiangjp@cib.ac.cn

角蟾亚科(Megophryinae)隶属锄足蟾科(Pelobatidae),是无尾类系统中的过渡而又较古老的类群。根据Fei et al(1990)对角蟾亚科和Zhao & Adler(1993)对无耳蟾属(*Atympanophrys*)的观点,角蟾亚科现有4属,即角蟾属(*Megophrys*)、短腿蟾属(*Brachytarsophrys*)、拟角蟾属(*Ophryophryne*)和无耳蟾属。该亚科共有30余种,其中多数种在我国有分布,某些属种的分类学问题尚有争议(Xie & Wang, 2000)。短腿蟾属和无耳蟾属是Tian & Hu(1983)根据其形态特征,把宽头大角蟾(*M. carinensis*)和沙坪角蟾(*M. shapingensis*)从角蟾属分出而分别建立。Dubois & Ohler(1998)认为短腿蟾属应作为亚属归隶角蟾属,但Fei et al(1990)、Zhao & Adler(1993)依据形态学上的资料仍将其作为一个有效属,而依据分子数据的分析结果尚有分歧,Liu & Yang(1994)根据同功酶的研究结果对短腿蟾属是否为独立属提出了疑问,但Rao & Yang(1997)的染色体研究却认为该属为有效属。由此看来,该属是否有效仍值得进一步研究。

对于无耳蟾属,Dubois & Ohler(1998)认为应是角蟾属的一个亚属,而Fei et al(1990)认为Tian & Hu(1983)的观察有误,该蟾实有耳柱骨,因此,无耳蟾属应是角蟾属的同物异名。Zhao & Yang(1997)也认为Tian & Hu(1983)建立无耳蟾属所依据的主要特征(即无耳柱骨)为解剖时观察有误所致,并建议恢复其原属称,即角蟾属。但Rao & Yang(1997)依据染色体的研究结果又认为无耳蟾属有效。这无疑增加了该属分类地位的复杂性。

在线粒体基因组中,与控制区和Cyt *b* 基因等相比,12*S* 和16*S* rRNA基因较为保守,即后两者的进化速率偏慢,很多研究常常应用它们来分析比较高级的分类阶元如科级间的系统发生关系(Hay et al, 1995);但Jiang & Zhou(2001a, b)报道12*S* rRNA基因在蛙科内亚科、属和种间也存在大的差异,能比较好地反映出它们的系统关系。因此,我们拟依据线粒体12*S* 和16*S* rRNA基因片段的序列数据,分析角蟾亚科部分属种的分子系统关系,进而探讨相应的系统学问题。

1 材料和方法

1.1 材 料

共分析了我国角蟾亚科的角蟾属7种(亚种)、短腿蟾属1种。同时以铃蟾属(*Bombina*)1种、齿蟾属(*Oreolalax*)1种、齿突蟾属(*Scutiger*)1种,共同作为外群进行比较分析。所有样品信息见表1,分类系统依据Fei(1999)。

表1 样品种类及采集地
Table 1 Species and localities of the samples

种名 Species	个体数 No. of samples	地点 Locality
外群 Outgroup		
东方铃蟾 *Bombina orientalis*	1	北京 Beijing
大齿蟾 *Oreolalax major*	1	四川洪雅 Hongya, Sichuan
西藏齿突蟾 *Scutiger boulengeri*	1	四川康定 Kangding, Sichuan
内群 Ingroup		
宽头短腿蟾 *Brachytarsophrys carinensis* (1)	1	四川西昌 Xichang, Sichuan
宽头短腿蟾 *B. carinensis* (2)	1	云南 Yunnan
宽头短腿蟾 *B. carinensis* (3)	1	四川九龙 Jiulong, Sichuan
小角蟾短肢亚种 *Megophrys minor brachykolos* (HK)	1	香港 Hong Kong
小角蟾短肢亚种 *M. minor brachykolos* (LS)	1	广西龙胜 Longsheng, Guangxi
小角蟾指名亚种 *M. minor minor*	1	四川九龙 Jiulong, Sichuan
沙坪角蟾 *M. shapingensis*	1	四川越西 Yuexi, Sichuan
尾突角蟾 *M. caudoprocta*	1	湖南桑植 Sangzhi, Huanan
峨眉角蟾 *M. omeimontis*	2	四川峨眉 Emei, Sichuan
腺角蟾 *M. glandulosa*	3	云南腾冲 Tengchong, Yunnan
角蟾种 *M.* sp	1	重庆武隆 Wulong, Chongqing

1.2 总 DNA 提取

取动物腿部肌肉（鲜样或酒精保存样品）适量，置 1.5 mL 的 Eppendorf 管中，加入裂解缓冲液（0.25 mol 蔗糖，10 mmol Tris-HCl，1 mmol EDTA，pH 8.0）450 μL 浸泡样品，然后再加入 10%SDS 50 μL，20 mg/mL 蛋白酶 K 10 μL，45 ℃水浴 3～24 h。然后采用常规酚－氯仿抽提法提取总 DNA，4 ℃保存备用。

1.3 目的基因片段的扩增和序列测定

扩增 12*S* rRNA 基因片段的引物为 L1091（5'-GCT TCA AAC TGG GAT TAG ATA CCC CAC TAT-3'），H1478（5'-TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTGT-3'）（Kocher et al，1989）；扩增 16*S* rRNA 基因片段的引物为 L（5'-CGCCTGTTTAC-CAAAAACAT-3'），H（5'-CCGGTCTGAACTCA-GATCACGT-3'）（Simon et al，1994）。L 代表上游引物，H 代表下游引物。反应体积为 30 μL，Promega 公司配备的反应缓冲液 3 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2.2 μL，2 mmol/L dNTP 2.2 μL，10 pmol/μL 引物各 1 μL，5 U/μL Taq 聚合酶 0.2 μL，总 DNA 1 μL（含 10～100 ng），ddH_2O 补足到 30 μL。PCR 反应在 PTC-200 或 PE-2400 型基因扩增仪上进行。95 ℃预变性 4 min；95 ℃变性 40 s，53 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 60 s，循环次数为 35 次；72 ℃再延伸 7 min。扩增产物用 Wizard™ PCR Preps DNA 纯化试剂盒（Promega 公司）纯化，最后根据琼脂糖电泳检测和定量。序列测定委托大连宝生物工程公司采用 ABI 377 基因分析仪测定。

1.4 序列分析

用 Clustal W 程序（Thompson et al，1994）对测定的序列进行对位排列，合并 12*S* 和 16*S* rRNA 基因片段序列，用 MEGA2.1（Kumar et al，2001）分析各物种间 DNA 序列差异，依据 Kimura 2-parameter 模型采用 MEGA2.1 中的邻接法（neighbor-joining method，NJ）推演系统关系。在重建系统树时，全部去除插入缺失和不定位点。同时用软件包 PHYLIP（version 3.5 c，Felsenstein，1985）中 SEQBOOT 软件将仅有简约信息位点的序列数据生成 100 个 republicate，用 DNAPARS（最大简约法）软件构建其系统关系树，最后用 CONSENSE 软件生成一致树。均用东方铃蟾、大齿蟾和西藏齿突蟾的相同基因片段的序列作为外群比较和用自举检测（bootstrap test，Felsenstein，1985）估计系统树中各结点的置信值。

2 结果与分析

2.1 DNA 序列特征

2.1.1 序列比对与位点特征　12*S* rRNA 序列用 Clustal W 软件进行比对排列，共有 383 bp，其中变异核苷酸位点 129，简约位点 77；内群物种间变异核苷酸位点 58，简约位点 51（图 1，位点序号在 383 以前），T、C、A、G 碱基平均含量分别为 24.6%、25.0%、28.3%、22.1%。16*S* rRNA 序列经 Clustal W 软件进行比对排列后共有 566 bp，其中变异核苷酸位点 191，简约位点 129；内群物种间变异核苷酸位点 101，简约位点 80（图 1，位点序号在 384 以后），T、C、A、G 碱基平均含量分别是 26.6%、23.3%、30.2%、19.8%。总的 T、C、A、G 碱基平均含量分别是 25.6%、24.0%、29.8%、20.6%，转换与颠换之比为 1.3。插入/缺失位点很少，内群仅有 8 处（图 1）。

2.1.2 同一物种内单倍型情况　从图 1 可知，宽头短腿蟾 3 个个体（采于不同地点）在 16*S* rRNA 基因上无替换发生，而在 12*S* rRNA 基因上发现 2 种单倍型，但只有 1 个碱基发生替换，即西昌个体由 C 转换为 G（图 1 中位点序号为 377）；腺角蟾 3 个个体间也仅在 12*S* rRNA 基因上发现 2 种单倍型，也只有 1 个碱基发生替换，即 2 个个体由 A 颠换为 G（图 1 中位点序号为 259）；而 2 个峨眉角蟾个体间则在 16*S* rRNA 基因上发生 3 处颠换，其中 1 处由 G 颠换为 A（图 1 中位点序号为 385），2 处由 T 颠换为 C（图 1 中位点序号分别为 390、391）。小角蟾短肢亚种的 2 个个体代表两个地理种群，它们间的碱基替换达 36 处，其中 11 处在 12*S* rRNA 基因段，25 处在 16*S* rRNA 基因段。

2.1.3 遗传距离特征　从序列特征情况看，在进行序列间核苷酸替换数的分析时采用 Kimura 2-parameter 模型比较适宜。表 2 为依据此模型求得的遗传距离，在外群和内群之间是 0.198（大齿蟾对宽头短腿蟾）到 0.243（西藏齿突蟾对腺角蟾）；在内群中，属内种间是 0.012（*M*.sp 对尾凸角蟾）到 0.116（短肢角蟾对腺角蟾），属间为 0.063（宽头短腿蟾对沙坪角蟾）到 0.110（宽头短腿蟾对腺角蟾）。外群中的大齿蟾和西藏齿突蟾代表拟髭蟾亚科（Leptobrachiinae）中两个相近属，即齿蟾属和齿突蟾属，它们间的遗传距离为 0.129。

Site order								
				11111111	1111111111	1111111111	1112222222	2222222222
	111122	2222233333	3445555789	9912223333	4444445667	7788889999	9990000011	1111122222
Species	3459056801	2348923456	8373789591	3765670356	0567897252	8902450123	5890137801	2578901234
B. orientalis	CTATCTAGCT	CAAAACACCA	CCAGCCCGCC	CAAAACCCTA	TACTTCTCAA	GCCGCCCGTG	GAA--TAGCA	CTATAAGTCA
O. major	.CG...T.T.	A.T..TTTT.	TA..GT...T	.T.G.TAAAC	.GT...A..G	T..ATTTA..	A.TTTC.ATT	.A..C.C...
S. boulengeri	T.G..CTA..	A.TTT.TA..	TA.A.AT.TT	....CTAA.T	C.....A..G	...AT.TT..	A..ACCG.TT	AG..TGAA..
B. carinensis (1)	....T.T.AA	AT------.-	T...GT.A.T	T....T.A.T	..TC..CTGT	...ATG.T..	.C.--.C.TT	A.GCCTAC.C
B. carinensis (2)	....T.T.AA	AT------.-	T...GT.A.T	T?...T.A.T	..TC..CTGT	...ATG.T..	.C.--.C.TT	A.GCCTAC.C
B. carinensis (3)	....T.T.AA	AT------.-	T...GT.A.T	T....T.A.T	..TC..CTGT	...ATG.T..	.C.--.C.TT	A.GCCTAC.C
A. shapingensis	...CT.T..A	AC------.C	TTG.GTTA.T	T....T.A.T	..TC.T.TGT	...ATG.TCA	.T.--.C.TT	T.GCCTAC..
M. m. brachykolos (HK)	...CT.T...	TC------.-	.T..GT.A.T	T?...T.A.C	...C....GT	.T.ATG.T.A	...--.C.TT	A.GCCTTCTT
M. omeimontis (1)	...CT.T.T.	A-------T-	.T..GT.A.T	T....T.A.C	..TC....GT	...ATG.A.A	.CT--AC.TT	A.GCTTTC.T
M. omeimontis (2)	...CT.T.T.	A-------T-	.T..GT.A.T	T....T.A.C	..TC....GT	...ATG.A.A	.CT--AC.TT	A.GCTTTC.T
M. sp	...CT.T.T.	T.------.-	.T..GT.A.T	T?...T.A.C	..TC....GT	...ATG.C.A	.CT--AC.TT	A.GCTTTC.T
M. caudoprocta	...CT.T.T.	T.------.-	.T..GT.A.T	T....T.A.C	..TC....GT	..AATG.C.A	.CC--AC.TT	A.GCTTTC.T
M. glandulosa (1)	...CT.T.TA	.T------.-	..G.GT.A.T	T.G..T.AC.	...CC...GT	.T.ATG.TCA	.G.--.T.TT	T.GCTTA...
M. glandulosa (2)	...CT.T.TA	.T------.-	..G.GT.A.T	T.G..T.AC.	...CC...GT	.T.ATG.TCA	.G.--.T.TT	T.GCTTA...
M. glandulosa (3)	...CT.T.TA	.T------.-	..G.GT.A.T	T.G..T.AC.	...CC...GT	.T.ATG.TCA	.G.--.T.TT	T.GCTTA...
M. m. brachykolos (LS)	.C.CT.T.T.	AC------.-	....GT.A.T	T....T.A.C	...C....GT	...ATG.T.A	...--.C.TT	A.GCCTTCTT
M. m. minor	...CT.T.T.	T-------.-	.T..GT.A.T	T?...T.A.C	..TC....GT	...ATG.C.A	.C.--AC.TT	A.GCTTTC.T

Site order	2222222222	2222222222	2233333333	3333333333	3333333333	3333333344	4444444444	4444445555
	2233455555	5667888889	9900000111	2223355555	5567777788	8999999900	1122333356	6889990011
Species	5902712678	9260056783	4602348678	0340902356	7801267915	9013456767	1439023710	3474590823
B. orientalis	CAACTGTAAG	TAAGCACC-G	CCAAAA-TTA	ACAATACATA	GTTTTCCGGG	CTTCAACTAG	TCACAGTCTT	ACTAATATAT
O. major	TG....A..A	CG..TTTT-T	..GC.GGCCT	.AT.C-----	---------.	T..A.CAC.A	...A.T.T..	G..G......
S. boulengeri	.....T....	...TTCAT-C	...TT.GCCT	.AT.C.TCGC	AA.A...AA.	T..A.C.C.A	...TTA.TC.	....G.....
B. carinensis (1)	.GTAC.A.GA	..C.TTTTTT	T...G.C.CT	..GCCG.TG.	.ACC.TGA..	T..A.TA.TC	.T.......C	GT......CC
B. carinensis (2)	.GTAC.A.GA	..C.TTTTTT	T...G.C.CT	..GCCG.TG.	.ACC.T.A..	T..A.TA.TC	.T.......C	GT......CC
B. carinensis (3)	.GTAC.A.GA	..C.TTTTTT	T...G.C.CT	..GCCG.TG.	.ACC.T.A..	T..A.TA.TC	.T.......C	GT......CC
A. shapingensis	.GTAC.A.GA	.GC.TC.AAC	.T..G.C.CT	GTGCCG.TG.	..CCCT.A..	T..A.TA.TA	.T.......C	GT.....CCA
M. m. brachykolos (HK)	..TAC.A.GA	.G..TC.AAC	....G.C.CT	.TGTCG.TG.	.CCA.T.A..	T..GGTAA.A	.T.......C	GT...CTCCC
M. omeimontis (1)	.GTAC.A.GA	.G..TCTAAA	TT..G.C.CT	.TGTCG.TG.	..C..T.A.A	TCCA.CA-..	.T.......C	GT.....CCA
M. omeimontis (2)	.GTAC.A.GA	.G..TCTAAA	TT..G.C.CT	.TGTCG.TG.	..C..T.A..	T..A.CAA..	.T.......C	GT.....CCA
M. sp	.GTAC.A.GA	.G..TCTAAC	TT..G.C.CT	.TGTCG.TG.	.CC..T.A..	T..A.CAA.A	.T....A..C	GT.....CCA
M. caudoprocta	.GTAC.A.GA	.G..TCTAAC	TT..G.C.CT	.TGTCG.TG.	.CC..T.A..	T..AGCAA.A	.T...AA..C	GT.....CCA
M. glandulosa (1)	.G.AC..GG.	.G...C.TTT	T...G.C.CT	.TGCCGTTG.	.CC....A..	...T.CTCCT	CTG......C	G.C....CCA
M. glandulosa (2)	.G.AC..GG.	.G...C.TTT	T...G.C.CT	.TGCCGTTG.	.CC....A..	...T.CTCCT	CTG......C	G.C....CCA
M. glandulosa (3)	.G.AC...G.	.G...C.TTT	T...G.C.?T	.TGCCGTTG.	.CC....A..	...T.CTCCT	CTG......C	G.C....CCA
M. m. brachykolos (LS)	..TAC.A.G.	.G..TCTAAC	TT..G.C.CT	.TGTCG.TG.	.AC..T?A..	T..AGTAA.A	.T.......C	GT.....CCG
M. m. minor	.GTAC.A.GA	.G..TCTAAC	TT..G.C.CT	.TGTCG.TG.	.CC..T.A..	T..AGTAA..	.T.......C	GT.....CCA

Site order	5555555555	5555555555	5555555566	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666
	1222222233	3334556666	6778888801	1122222222	3333333334	4444444555	5555566666	6666777777
Species	9012345656	7891892367	9450123433	8901245689	1234567890	1235679013	4568901245	6789012345
B. orientalis	GAGTTCAACC	CACCCTCCGC	GGGAAAACCT	TAA--GGCCT	GC-TCTTAAT	TTACCCAGGC	AAACATTAAC	CAGTTAAAGT
O. major	.GAC.T....	.CT...A.A.	A.T...CTTA	C..---AA.C	C.TAT....C	C..TATTTAT	-.TTTACT.A	ATAA..GGCC
S. boulengeri	.GAC.T.G.T	A.TT...T.A	AA.TTTTTT.	C..---AA..	C.CGT.....	C..TATCTAA	G.TGTACT.A	ACAACTG.TC
B. carinensis (1)	.GAC.T...T	TGT...T...	..ATCTCTT.	...-ATCA..	TTA.TCCTC.	A.CT.T....	CC.T.AACG.	T.AA..TGC.
B. carinensis (2)	.GAC.T...T	TGT...T...	..ATCTCTT.	...-ATCA..	TTA.TCCTC.	A.CT.T....	CC.T.AACG.	T.AA..TGC.
B. carinensis (3)	.GAC.T...T	TGT...T...	..ATCTCTT.	...-ATCA..	TTA.TCCTC.	A.CT.T....	CC.T.AACG.	T.AA..TGC.
A. shapingensis	.GAC.T...T	TGT...T...	..A.TT..T.	...-ATCA..	TT-.T.A.C.	.CTT.....A	TT...GAT.T	..AA..TGC.
M. m. brachykolos (HK)	.GACCT..TT	TGT..C....	...TCT..T.	.TT-TTTAT.	TTTC...C.C	.CCT.....T	TT...ACT..	TTAA.CTTC.
M. omeimontis (1)	.GAC.T..TT	TGT...T...	..ATTTCTT.	.TTATTCA..	T.T....C.C	CCCT.T...A	CT...CCT.T	T.AA.TTC-.
M. omeimontis (2)	.GAC.T..TT	TGT...T...	..ATTTCTT.	.TTATTCA..	T.T....C.C	CCCT.T...A	CT...CCT.T	T.AA.TTC-.
M. sp	.GAC.T...T	TGT...T...	..A.TTC.T.	.TTATTCAT.	T.T....T..	CCCT.T...A	CT...CCC.T	T.AA.TCCC.
M. caudoprocta	.GAC.T..TT	TGT.T.T...	..A.TTC.T.	.TTTTTCAT.	T.T....T..	CCCT.T...A	CT.T..CC.T	TTAA.TCCC.
M. glandulosa (1)	AGAC.TG...	TGT...TT..	..A.C.C.TC	.C.ATTTAT.	C.-.TAA..C	CCCT.T...G	CC...AAT.T	TTT.....C.
M. glandulosa (2)	AGAC.TG...	TGT...TT..	..A.C.C.TC	.C.ATTTAT.	C.-.TAA..C	CCCT.T...G	CC...AAT.T	TTT.....C.
M. glandulosa (3)	AGAC.TG...	TGT...TT..	..A.C.C.TC	.C.ATTTAT.	C.-.TAA..C	CCCT.T...G	CC...AAT.T	TTT.....C.
M. m. brachykolos (LS)	.GACCT..TT	AGT...T...	..ATTT..T.	.TT-TTTAT.	TTT....C.C	-CCT.T...A	TT...ACC.T	TTAA.TT.T.
M. m. minor	.GAC.T..TT	TGT...T...	..ATTTC.T.	.TTCTTCAT.	T.T....T..	CCCT.T...A	TT...C.C.T	T.AA.TTTC.

Site order	6666666666	6777777777	7777777777	7777777777	7777777777	7777777778	8888888888	8899999999
	7777888889	9000111112	2223344444	4455555666	6677777788	8888899990	0124455567	9900001222
Species	6789012390	8234134564	5781212346	8903589035	7923567834	5678926890	1264906880	4801474035
B. orientalis	GACCTGTCCG	CCACGACAAG	AATAACCTTG	CAACCAATTA	CAGACATCGC	ACCTACAA	AAGTTCTAAA	CGCTTCGGAG
O. major	T.GT.TAG.A	TTGTA.TT.A	TTAC--T.A.	TT.GACGCCT	.T.CAGC.TT	TACTT..ATT	TGACCA...G	TAA.AT.A..
S. boulengeri	T.GT.TAG.A	TTGTA.T..A	TCAC--T.A.	TTTGACGC.C	.T.CAG..TG	CACTT...TT	T.AC.AC..G	TAACGT.ACA
B. carinensis (1)	TGAT.TAAA.	...TA.G..C	T..C-.ACAA	...G.TGC..	TTAG..CTT.	TA.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A.ATAA.T
B. carinensis (2)	TGAT.TAAA.	...TA.G..C	T..C-.ACAA	...G.TGC..	TTAG..CTT.	TA.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A.ATAA.T
B. carinensis (3)	TGAT.TAAA.	...TA.G..C	T..C-.ACAA	...G.TGC..	TTAG..CTT.	TA.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A.ATAA.T
A. shapingensis	TGATATAAA.	...TA.G..C	T..CT.ACAA	...G.GGC..	TTAGT.CTTT	CC.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A.ATAA.A
M. m. brachykolos (HK)	T.ATAAAAG.	...TAGA..C	T..TTA.C.A	T..A..GC..	TTAG..CTTA	TT.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A.ATAA.A
M. omeimontis (1)	TGATAAAAG.	...TA.G..C	T..T.A.C.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CT.TTCTTT.	-.ACCAC..G	..A.ATAA.A
M. omeimontis (2)	TGATAAAAG.	...TA.G..C	T..T.A.C.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CT.TTCTTT.	-.ACCAC..G	..A.ATAA.A
M. sp	TGATAAAAG.	...TA.G..C	T..C.A.C.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CT.TTCTTT.	-.ACCA.C.G	..A.ATAA.A
M. caudoprocta	TGATAAAAG.	...TA.G..C	T..C.A.C.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CT.TTCTTT.	-.ACCA.CGG	..A.ATAA.A
M. glandulosa (1)	T-ATAT.AA.	...TA.A.TC	T..CTTTC.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CC.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A..T.A.C
M. glandulosa (2)	T-ATAT.AA.	...TA.A.TC	T..CTTTC.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CC.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A..T.A.C
M. glandulosa (3)	T-ATAT.AA.	...TA.A.TC	T..CTTTC.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CC.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A..T.A.C
M. m. brachykolos (LS)	T.ATAAAAG.	...TA.A.TC	T....A.C.A	...G..GC..	TTAG..CTT.	CT.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A.ATAA.A
M. m. minor	TGATAAAAG.	...TA.G..C	T..T.A.C.A	...G..GC..	TTAG..CTTA	TT.TTCTTT.	-.ACCACC.G	..A..T.A.A

图1 角蟾亚科8种（亚种）12*S*和16*S* rRNA基因片段序列比对后的320个变异位点

Fig.1 320 variable sites of sequences pair-wised of mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA genes from eight species (subspecies) of Megophryinae

. 为一致性位点，? 为不确定位点，- 为插入缺失位点（. Identical，? Missing，- Indel）。

表 2　角蟾亚科 8 种（亚种）12*S* 和 16*S* rRNA 基因片段序列 Kimura 2-parameter 距离（成对比较时去除插入缺失）

Table 2　Kimura 2-parameter distance among mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA genes from eight species (subspecies) of Megophryinae with indel deleted in each pairwise comparison of sequences

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 *B. orientalis*																
2 *O. major*	0.230															
3 *S. boulengeri*	0.230	0.129														
4 *B. carinensis* (1)	0.215	0.199	0.226													
5 *B. carinensis* (2)	0.214	0.198	0.225	0.001												
6 *B. carinensis* (3)	0.214	0.199	0.224	0.001	0.000											
7 *A. shapingensis*	0.221	0.218	0.232	0.064	0.063	0.063										
8 *M. m. brachykolos* (HK)	0.217	0.225	0.241	0.103	0.102	0.102	0.086									
9 *M. omeimontis* (1)	0.217	0.204	0.231	0.085	0.084	0.083	0.076	0.066								
10 *M. omeimontis* (2)	0.213	0.201	0.228	0.082	0.081	0.081	0.074	0.062	0.003							
11 *M.* sp	0.213	0.206	0.232	0.083	0.082	0.082	0.072	0.064	0.023	0.020						
12 *M. caudoprocta*	0.223	0.213	0.238	0.091	0.089	0.089	0.082	0.067	0.034	0.030	0.012					
13 *M. glandulosa* (1)	0.209	0.224	0.243	0.110	0.109	0.109	0.104	0.116	0.106	0.103	0.100	0.108				
14 *M. glandulosa* (2)	0.209	0.224	0.243	0.110	0.109	0.109	0.104	0.116	0.106	0.103	0.100	0.108	0.000			
15 *M. glandulosa* (3)	0.206	0.223	0.242	0.109	0.108	0.108	0.103	0.115	0.105	0.102	0.098	0.107	0.001	0.001		
16 *M. m. brachykolos* (LS)	0.211	0.220	0.227	0.090	0.090	0.090	0.080	0.041	0.043	0.039	0.043	0.045	0.102	0.102	0.101	
17 *M. m. minor*	0.212	0.217	0.236	0.082	0.081	0.081	0.074	0.052	0.028	0.024	0.020	0.026	0.104	0.104	0.102	0.038

2.2　物种系统进化关系

图 2 中左为用 NJ 法选用 Kimura 2-parameter 模型、驱除插入缺失和不定位点所得系统进化关系树，右为用最大简约法所得系统进化关系树。两种方法的分析结果一致表明，内群的 14 个样本聚为单系群，其结点的自展检验值（BSP）很高，均达到 100%；其中 3 个物种即峨眉角蟾、宽头短腿蟾和腺角蟾有多个个体，它们都各自聚为一支，其结点 BSP 都达到 100%。在内群的 8 种（亚种）中，首先分出的是腺角蟾，这表明它与其余物种的进化关系最远；沙坪角蟾与宽头短腿蟾聚为一支，提示二者之间有较近的亲缘关系；余下的 5 种（亚种）角蟾聚为一支，其中小角蟾短肢亚种香港种群和广西龙胜种群首先相聚，峨眉角蟾、小角蟾指名亚种、尾凸角蟾和重庆武隆的角蟾种相聚，后两种进化关系明显最近。

3　讨　论

3.1　12*S* 和 16*S* rRNA 基因在动物系统学中的应用

很多研究常常应用 12*S* 和 16*S* rRNA 基因来分析比较高级的分类阶元如科级间的系统发生关系（Hay et al，1995）。本研究发现，12*S* 和 16*S* rRNA 基因在锄足蟾科中的亚科、属和种间存在大的差异，甚至能检测到种内个体间的差异，并能很好地反映它们的系统关系。这与 Jiang & Zhou（2001a, b）报道的 12*S* rRNA 基因在蛙科内亚科、属和种间的研究情况相似。因此，应用这两个基因研究较低分类阶元的系统关系是适宜的。

3.2　角蟾亚科部分属种的分子进化关系

关于角蟾亚科部分属种的分子进化关系，Liu & Yang（1994）依据同功酶电泳资料认为，与峨眉角蟾相比，腺角蟾［原文为白领大角蟾（*M. lateralis*）。有关这两个种的问题详见 Fei & Ye（2000），后同］与短腿蟾属的费氏短腿蟾（*B. feae*）进化关系较近；Rao & Yang（1997）依据染色体数据分析把腺角蟾和峨眉角蟾划入同一组；而本分析结果表明峨眉角蟾与短腿蟾属物种进化关系较近，与腺角蟾的进化关系较远，同时表明短腿蟾属物种与沙坪角蟾的进化关系更近（图 2）。

根据已有报道的角蟾亚科物种染色体研究资料（Li et al, 1993, 1996; Li & Hu, 1996; Liu & Yang,

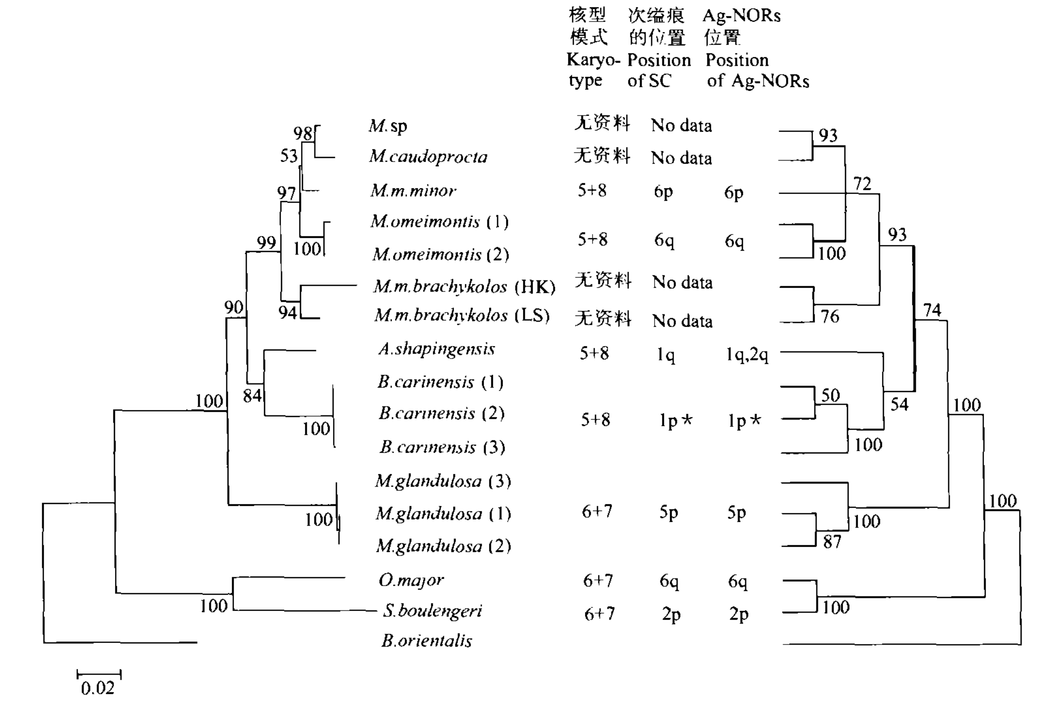


图 2 角蟾亚科 8 种（亚种）的系统进化关系

Fig.2 Phylogenetic relationships of 8 species (subspecies) of Megophryinae

左为 NJ 法，右为 MP 法。图中数字为自举检验置信值，NJ 法中 1 000 重复，MP 法中 100 重复。中部为染色体数据，* 为费氏短腿蟾（*B.feae*）资料（自李树深等，1993）。

The left is from NJ method, and the right is from MP method. Numbers on the tree represent confidence values from bootstrap test, which 1 000 replicates in NJ and 100 in MP. The middle columns are the karyotype, and the position of SC and Ag-NORs, and * is of *B.feae* (from Li et al, 1993).

1998; Wu, 1987; Zeng & Wu, 1989; Morescalchi, 1973; Morescalchi et al, 1977; Schmid et al, 1987; Rao & Yang, 1997)，核型模式有 6 + 7 和 5 + 8 二种类型。本文腺角蟾核型模式属 6 + 7 类型，而宽头短腿蟾、沙坪角蟾、小角蟾指名亚种和峨眉角蟾则属 5 + 8 类型。5 + 8 模式是 6 + 7 模式通过不等易位形成的(Morescalchi, 1973; Morescalchi et al, 1977)。这表明腺角蟾的核型处于原始状态，在一定程度上支持本文的分子进化分析结果(图 2)，即腺角蟾首先与其他物种分开；因此，不支持 Rao & Yang(1997)把峨眉角蟾与腺角蟾归隶一组。

在核型为 5 + 8 模式的角蟾中，次缢痕和 Ag-NORs 多出现在第 5 号或第 6 号染色体上，大多数角蟾仅显示 1 对 Ag-NORs。沙坪角蟾和费氏短腿蟾（宽头短腿蟾缺资料）的情况较为特别，次缢痕和 Ag-NORs 均出现在 1 号染色体上，而且沙坪角蟾有 2 对 Ag-NORs，分别位于第 1 号染色体长臂近着丝粒区域（$1q^{per}$）和第 2 号染色体长臂近着丝粒区域（$2q^{per}$）（Li & Hu, 1996）。由此看来，短腿蟾属物种和沙坪角蟾在核型为 5 + 8 类型的角蟾亚科物种中较为特化，有较近的进化关系。这显然不支持 Rao & Yang（1997）的（（角蟾属，短腿蟾属）无耳蟾属）式样的进化关系树；而与本文分析结果一致，即这两个物种聚为一支，然后与其他物种构成的另一支成为姐妹群（图 2）。

3.3 角蟾亚科部分属种的分类学问题

本文中的短肢角蟾为 Inger & Romer（1961）所定新种，Ye & Fei（1995）依据形态特征分析认为它是小角蟾的三个亚种之一，同时把广西的小角蟾归隶该亚种即短肢亚种；另两个分别是新亚种即宾川亚种 *M.m.binchuanensis* Ye et Fei 和指名亚种 *M.m.minor*，包括本文九龙的小角蟾。Dubois & Ohler（1998）把这 3 个亚种提升为种级，并被 Amphibian Species of the World（version 2 online, Frost, 2002）采纳。根据上述作者的描述和我们对实物标本的查看，我们认为恢复短肢角蟾为有效种

是适宜的。本文的分子系统关系（图 2）和遗传距离（表 2）也支持它们是不同的种。

本文短肢角蟾中两个地理种群即广西龙胜种群和香港种群间的分子系统关系很近，它们首先相聚为一支（图 2），这在一定程度上支持 Ye & Fei (1995) 把它们归为同一亚种的观点。同时，这两个种群间的遗传距离为 0.041（表 2），与种间的遗传距离相近，例如它与小角蟾的遗传距离为 0.038，与峨眉角蟾为 0.039 和 0.043。这提示短肢角蟾的这两个种群间的遗传分化可能达到种级。我们将从形态学上进一步研究他们之间的关系。

本文依据线粒体 12*S* 和 16*S* 基因部分序列数据，采用 NJ 法和 MP 法构建的系统关系树（图 2）均一致地表明，腺角蟾首先与其他物种分开；宽头短腿蟾与沙坪角蟾关系很近，相聚为一支，结点支持值较高；这一支与另 5 种角蟾组成的一支形成姐妹群，并有高的结点支持值。这提示腺角蟾、沙坪角蟾、宽头短腿蟾可能隶属 3 个不同的亚属或属。

致谢：费梁、李健、李胜全、李成先生协助采集部分标本，宽头短腿蟾云南样品为王跃招先生提供，叶昌媛先生提供部分重要文献资料，在香港考察与采集标品期间得到野生动物保护基金会有限公司孙启元先生及其助手们的大量帮助，两位匿名审稿者和编辑部热情提出建设性修改意见。谨致衷心感谢！

参考文献：

Dubois A, Ohler A. 1998. A new species of *Leptobrachium* (*Vibrissaphora*) from northern Vietnam, with a review of the taxonomy of the genus *Leptobrachium* (Pelobatidae, Megophryinae) [J]. *Dumerilia*, **4** (1): 1 - 32.

Fei L. 1999. Atlas of Amphibians of China [M]. Zhengzhou: Henan Publishing House of Science and Technology. 1 - 432. [费　梁. 1999. 中国两栖动物图鉴. 郑州：河南科学技术出版社. 1 - 432.]

Fei L, Ye CY. 2000. Taxonomic discussion of *Megophrys lateralis* (Anderson) and related species (Amphibia: Pelobatidae) [J]. *Cultum Herpetological Sinica*, **8**: 59 - 63. [费　梁，叶昌媛. 2000. 白领大角蟾及其相关物种的分类探讨（两栖纲：锄足蟾科）. 两栖爬行动物学研究，**8**：59 - 63.]

Fei L, Ye CY, Huang YZ. 1990. Key to Chinese Amphibia [M]. Chongqing: Chongqing Branch, Science and Technology Literature Publishing House. 1 - 364. [费　梁，叶昌媛，黄永昭. 1990. 中国两栖动物检索. 重庆：科学技术文献出版社重庆分社. 1 - 364.]

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, **39**: 783 - 791.

Frost DR. 2002. Amphibian Species of the World: An Online Reference [DB/OL]. V2.21 (15 July 2002). Electronic database available at http: //research. amnh. org/herpetology/amphibia/index. html.

Hay JM, Ruvinsky I, Hedges SB, Maxon LR. 1995. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12*S* and 16*S* ribosomal RNA genes [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **12** (5): 928 - 937.

Inger RF, Romer JD. 1961. A new pelobatid frog of the genus *Megophrys* from Hong Kong [J]. *Fieldiana*: *Zool.*, **39** (45): 533 - 538.

Jiang JP, Zhou KY. 2001a. Evolutionary relationships among Chinese ranid frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of 12*S* rRNA gene [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **47** (1): 38 - 44. [江建平，周开亚. 2001a. 从 12*S* rRNA 基因序列研究中国 24 种蛙的进化关系. 动物学报，**47**（1）：38 - 44.]

Jiang JP, Zhou KY. 2001b. Phylogenetic relationships of Chinese brown frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of 12*S* ribosomal RNA gene [J]. *Zool. Res.*, **22** (1): 27 - 32. [江建平，周开亚. 2001b. 中国林蛙的分子系统关系. 动物学研究，**22**（1）：27 - 32.]

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6169 - 6200.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software [CP]. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Li SS, Hu JS. 1996. Karyotype and Ag-NORs of four tailless amphibians [J]. *Chinese Journal of Zoology*, **31** (6): 13 - 16. [李树深，胡健生. 1996. 四种无尾两栖动物的核型和银染. 动物学杂志，**31**（6）：13 - 16.]

Li SS, Fei L, Ye CY. 1993. The cytogenetic study on three species of *Megophrys* from Yunnan [J]. *Acta Genetica Sinica*, **20** (1): 26 -32. [李树深，费　梁，叶昌媛. 1993. 云南三种角蟾的细胞遗传学研究. 遗传学报，**20**（1）：26 - 32.]

Li SS, Hu JS, Fei L. 1996. The cytogenetic study on five pelotoid species of anuran in China [J]. *Zool. Res.*, **17** (2): 173 - 178. [李树深，胡健生，费　梁. 1996. 中国五种锄足蟾科无尾两栖动物的细胞遗传学研究. 动物学研究，**17**（2）：173 - 178.]

Liu WZ, Yang DT. 1994. An allozyme electrophoresis study on eleven species of Megophrinae in China [J]. *Zool. Res.*, **15** (suppl.): 182 - 192.

Liu WZ, Yang DT. 1998. Study on karyotype, C-banding and Ag-NORs of two populations of *Megophrys lateralis* from Gaoligongshan, Yunnan Province [J]. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, **4** (2): 148 - 151. [刘万兆，杨大同. 1998. 云南高黎贡山白领大角蟾的核型、C - 带及 Ag-NORs 的研究. 应用与环境生物学报，**4**（2）：148 - 151.]

Morescalchi A. 1973. Amphibia [A]. In: Chiarelli AB, Capanum E. Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution [M]. London: Acad. Press. 233 - 348.

Morescalchi A, Olmo E, Stigo V. 1977. Trends of karyological evolution in pelobatid frogs [J]. *Experientia*, **33** (12): 1577 - 1578.

Rao DQ, Yang DT. 1997. The karyotype of Megophryinae (Pelobatidae) with a discussion on their classification and phylogenetic relationships [J]. *Asiatic Herptological Research*, **7**: 93 - 102.

Schmid M, Vitelli L, Batistoni R. 1987. Chromosome banding in Am-

phibia: Ⅺ. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, $18S+28S$ and $5S$ ribosomal RNA genes in Acaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae [J]. *Chromosoma*, **95**: 271-284.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, **87** (6): 651-701.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson DJ. 1994. CLUSTALw: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl. Acid. Res.*, **22**: 4673-4680.

Tian WS, Hu QX. 1983. Taxonomic study on genus *Megophrys*, with description of two new genera [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **2** (2): 41-48. [田婉淑, 胡其雄. 1983. 我国角蟾的分类研究兼记二新属. 两栖爬行动物学报, **2** (2): 41-48.]

Wu GF. 1987. Cytotaxonomical studies on Chinese pelobatids: Ⅲ. The analysis of the karyotypes of *Megophrys lateralis* and *Atympanophrys shapingensis* [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **6** (3): 45-48. [吴贯夫. 1987. 中国锄足蟾科的细胞分类学研究——Ⅲ. 白颌大角蟾和无耳蟾的核型分析. 两栖爬行动物学报, **6** (3): 45-48.]

Xie F, Wang ZW. 2000. Review on the systematics of pelobatids [J]. *Cultum Herpetologica Sinica*, **8**: 356-370. [谢 锋, 王祖望. 2000. 锄足蟾科系统学研究评述. 两栖爬行动物学研究, **8**: 356-370.]

Ye CY, Fei L. 1995. Taxonomic studies on the small type *Megophrys* in China including descriptions of the new species (subspecies) (Pelobatidae: Genus *Megophrys*) [J]. *Cultum Herpetologica Sinica*, **4-5**: 72-81. [叶昌媛, 费 梁. 1995. 我国小型角蟾的分类研究及其新种（新亚种）的描述. 两栖爬行动物学研究, **4-5**: 72-81.]

Zeng XM, Wu GF. 1989. Cytotaxonomical studies on Chinese pelobatids: Ⅴ. The karyotypes, C-bands and Ag-NORs of *Megophrys omeimontis* and *Oreolalax schmidti* [J]. *Chinese Herpetological Research*, **2** (2): 37-45.

Zhao EM, Adler K. 1993. Herpetology of China [J]. *Contrib. Herpetol.*, **10**: 1-522.

Zhao EM, Yang DT. 1997. Amphibians and Reptiles of the Hengduan Mountains Region [M]. Beijing: Sciences Press. 1-303, 47 (plates Ⅷ). [赵尔宓, 杨大同. 1997. 横断山区两栖爬行动物. 北京: 科学出版社. 1-303, 47 (图版Ⅷ).]